

PARTIAL TRANSLATION OF JP 57-161650 A FOR IDS

(19) Japanese Patent Office (JP)  
(12) Official Gazette (A)  
(11) Publication Number: Sho 57-161650  
(43) Date of Publication: October 5, 1982  
(51) Int. Cl. G01N 33/52  
31/22  
33/50

Number of Inventions: 2 (total 11 pages)

Request for Examination: Submitted

(54) Test Tool for Determining Active Oxidant in Test Sample and Method for Manufacturing the Same  
(21) Application Number: Sho 57-39596  
(22) Date of Filing: March 15, 1982  
Claim for Priority (32) March 16, 1981 (33) United States (US)  
(31) 244044  
(72) Inventor: Allan Elmer BARKHEART  
[Translation of Address Omitted]  
(72) Inventor: Ann Marie TIDEMANN  
[Translation of Address Omitted]  
(71) Applicant: Miles Laboratories, Inc.  
[Translation of Address Omitted]  
(74) Representative: Patent Attorney Hajime TSUKUNI

[Page 313 bottom left col. line 6 – bottom right col. line 13]

1. A test tool that is useful for determining a presence of active oxidant in a test sample and resistant to an inhibition of ascorbate present in the sample,

characterized in that the test tool is formed of a carrier matrix comprising an organic hydroperoxide,

an indicator capable of providing a detectable response in the presence of the active oxidant and peroxide,

a condensed ring compound having a Co(III) complex and the structural formula:  (wherein R is a substituted or unsubstituted carbocyclic or heterocyclic residue, with the ring having 4 to 7 carbon atoms).

2. The test tool according to claim 1, wherein the Co(III) complex is  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ , cobalt (III) acetylacetonato,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_3$ ,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{CO}]\text{NO}_3$ ,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  or a mixture thereof.
3. The test tool according to claim 1, wherein the compound is 6-methoxyquinoline, 5,6-benzoquinoline, 4-azafluorene, 10H-pyrido[3,2-b]-[1,4]benzothiazine, 6-hydroxyquinoline or a mixture thereof.
4. The test tool according to claim 1, wherein the Co(III) complex is  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ .
5. The test tool according to claim 1, wherein the compound is 6-methoxyquinoline.

[Page 317 top right col. line 11 – bottom left col. line 2]

The Co(III) complexes useful in the present invention include  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ , cobalt (III) acetylacetonato,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_3$ ,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{CO}_3]\text{NO}_3$ ,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  and others. Of course, it is understood that many other Co(III) complexes also are applicable to the present invention taught here.  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  showed an excellent result and was found to be a preferable complex for reducing the inhibition of ascorbate. In a preferable mode of the present invention, the composition is composed of cumene hydroperoxide, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ .

\* \* \* \* \*

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開  
 ⑪ 公開特許公報 (A) 昭57-161650

⑫ Int. Cl. <sup>3</sup> G 01 N 33/52 31/22 33/50	識別記号	序内整理番号 6422-2G 6514-2G 6422-2G	⑬ 公開 昭和57年(1982)10月5日 発明の数 2 審査請求 有
---	------	---	---

(全 11 頁)

④ 試験試料中の過酸化活性物質を測定するための試験具及びその製造方法

⑪ 特願 昭57-39596

⑫ 出願 昭57(1982)3月15日

優先権主張 ⑬ 1981年3月16日 ⑭ 米国(US)  
⑪ 244044

⑪ 発明者 アラン・エルマー・バークハート  
アメリカ合衆国インヂアナ4651  
4エルクハート・ストーニー・クリーク・ドライブ51818

⑪ 発明者 アン・マリー・タイドマン  
アメリカ合衆国ミシガン49112  
エドワーズバーグ・モートン・ドライブ68570

⑪ 出願人 マイルス・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国インヂアナ4651  
5エルクハート・ミルトル・ストリート1127ビー・オー・ボックス40

⑪ 代理人 弁理士 津国盛

明細書

1. 発明の名称

試験試料中の過酸化活性物質を測定するための試験具及びその製造方法

2. 特許請求の範囲

1. 試験試料中の過酸化活性物質の存在を測定するのに有用であり、試料中に存在するアスコルビン酸塩の妨害作用に対し抵抗性を有する試験具であつて、

該試験具が、

有機ヒドロペルオキシドと、

該過酸化活性物質及び過酸化物の存在下で検知可能な応答を与えることのできる指示薬と、

Co(II) 錫体及び構造式: B  (ここで、B は置換若しくは非置換の炭素環又は複素環系の残基で、該環は原子数4~7を有している。) を有する結合環化合物と

を包含した組体から成ることを特徴とする試験具。

2. 該 Co(II) 錫体が、Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>、コバルト(II)ア

セチルアセトナト、[Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O]Cl<sub>2</sub>、[Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>CO]NO<sub>3</sub>、[Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>CO<sub>3</sub>]NO<sub>3</sub>・3H<sub>2</sub>O、又はそれらの混合物である特許請求の範囲第1項記載の試験具。

3. 該化合物が、6-メトキシキノリン、6,6-ベンゾキノリン、4-アザフルオレン、1-OH-1,4-ビリド[3,2-b]-[1,4]ベンゾチアジン、6-ヒドロキシキノリン又はそれらの混合物である特許請求の範囲第1項記載の試験具。

4. 該 Co(II) 錫体が、Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>2</sub>である特許請求の範囲第1項記載の試験具。

5. 該化合物が、6-メトキシキノリンである特許請求の範囲第1項記載の試験具。

6. 試験試料中の過酸化活性物質の存在を測定するのに有用であり、試料中に存在するアスコルビン酸塩の妨害作用に対し抵抗性を有する試験具の製造方法であつて、

該方法が、

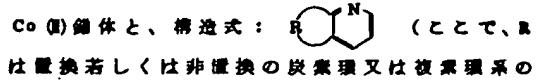
有機ヒドロペルオキシドと、適当な溶媒中に該ヒドロペルオキシド及び該過酸化活性物質の存

在下で検知可能な応答を与えることのできる指示薬を含む第1の試薬混合物を調製し：

該第1試薬混合物を粗体と接触させ；

該粗体を乾燥して、それにより該有機ペルオキシドと該指示薬を包含させ；

該Co(II)錯体と、構造式：



は置換若しくは非置換の炭素環又は複素環系の残基で、該環は原子数4～7を有している。)を有する結合環化合物との水溶液から成る第2の試薬混合物を調製する；

一連の工程から構成されることを特徴とする方法。

7. 該Co(II)錯体が、 $Co(NH_3)_6Cl_6$ 、コバルト(II)アセチルアセトナト、 $[Co(NH_3)_6H_2O]Cl_6$ 、 $[Co(NH_3)_6CO]NO_3$ 、 $[Co(NH_3)_6CO]NO_3 \cdot 3H_2O$ 又はそれらの混合物である特許請求の範囲第6項記載の方法。

8. 該化合物が、6-メトキシキノリン、5,6-ベンジキノリン、4-アザフルオレン、10H-ビリド[3,2-b]-[1,4]ベンゾチアジ

ン、6-ヒドロキシキノリン又はそれらの混合物である特許請求の範囲第6項記載の方法。

9. 該 $Co(II)$ 錯体が、 $Co(NH_3)_6Cl_6$ である特許請求の範囲第6項記載の方法。

10. 該化合物が、6-メトキシキノリンである特許請求の範囲第6項記載の方法。

### 3. 発明の詳細を説明

本発明は、試験試料中の過酸化活性物質の測定に関する。更に詳細にいうと、例えば試料中にも存在しているかもしれないアスコルビン酸からのあり得るであろう悪影響に対し抵抗するような測定のための試験具に関する。

多くの分析方法が、尿、糞便濁物及び胃腸内の含有物のような試料中の過酸化活性物質の存在を検出するために、現在、利用されている。ヘモグロビンとその誘導体は、それらが酵素ペルオキシダーゼと同じ様に挙動するので、そのような“過酸化活性”物質の典型である。このような物質は、擬似ペルオキシダーゼ（ブソイドペルオキシダーゼ）類とも言われてきた。過酸化活性物質は、過

酸化物及びベンジジン、0-トリジン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、2,7-ジアミノフルオレンのような指示薬化合物又は同様を指示薬物質間での酸化還元（レドックス）反応に触媒作用を及ぼし、そのことによつて色変化のような検出可能な応答を示すという点で酵素類似物である。このことから、試験試料中の潜血の存在を測定するほとんどの方法は、この擬似ペルオキシダーゼ活性に依拠している。

色を形成する指示薬の過酸化物による酸化反応に対する酵素様触媒作用に依拠するいくつかの方法が、多年に亘り発達してきた。基本的には、これららの方法は便式の化学的方法及び試薬を粗特した“浸漬-読み取り”型の試験片を包含している。前者のうちの典型的な例は、リチャード・エム・ヘンリー (Richard M. Henry) 等の「化学的な化学の基礎及び手法」(ヘガースタウン、メリーランド: ハーバー・アンド・ロー、1974) (Chemical Chemistry Principles and Techniques (Hagerstown, Maryland: Harper and Row,

1974) ] 1124～1125頁の中に述べられている。この方法は、水酢酸（緩衝剤）、ジフェニルアミン（指示薬）及び過酸化水素を使用している。このような便式方法は、分析可能性を立証してきたが、にもかかわらず、それらは明白な欠点を伴うものである。それらの欠点の多くは試薬が安定性に乏しくまた感度が不充分であり、アスコルビン酸の干渉に敏感であるということである。

過酸化活性物質の測定のための第2の方法で、殆んどの臨床検査技師及び分析者によつて現在好まれている方法は、いわゆる“浸漬-読み取り”試験片を用いるものである。典型的なそのような試験具は、ザームス・ディヴィジョン・オブ・マイルス・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド (the Ames Division of Miles Laboratories, Inc.) で製造され、ヘマステイクス (HEMASTIX<sup>®</sup>) の名で販売されている試験片である。これらは、本質的には、プラスチック片又は把手に固定された多孔質の紙片から構成される。この粗体 (matrix) には、有機ヒドロペルオキシド及び0-ト

リジンの酸化された混合物が含まれている。ヘモグロビン、ミオグロビン、赤血球又は他の類似ペルオキシダーゼを含む液体中に浸漬すると、粗体には青色が発色し、その強度は試料中の過酸化活性物質の濃度に比例する。このようにして、粗体に発色した色を標準色標と比較することによつて、検査技師は、試料中に存在する分析対象物の量を、半定量的に測定することができる。

試薬片が湿式の化学的方法に優る利点は、主として2点ある。すなわち、試薬片は試薬類の調製又は付属装置を必要としないので使用が簡単であり、さらに、試薬類のより大きな安定性が与えられるので、その結果、改善された精度、感度及び経済性をもたらす。

しかしながら、尿分析の場合、ビタミンC(アスコルビン酸)を高濃度(単位)で含む最近流行の食物は、そのような食物を摂取した患者が、必ずといってよい程、尿中アスコルビン酸塩の濃度を不規則に高め、かつ、アスコルビン酸塩が試験を妨害するため、尿のような尿中成分の分析に

おいて重大な問題を惹起している。

アスコルビン酸塩のような還元剤の悪影響は、早くも1938年に知られていた。アル・コーン(R. Kohn)とアル・エム・ワトラウス(R. M. Watrous), ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry), 124, 163~168 (1938) 参照。同じ問題が依然としてこの分野の分析を悩ませていることが、尿中の尿酸(類似ペルオキシダーゼ)の分析を行なう場合、正確な尿酸の測定を行なうためには、同時にアスコルビン酸の分析を行わねばならないという1979年の提言から明らかである。エル・ニールセン(L. Nielsen), ピー・ジエイ・ヨルゲンセン(P. J. Jorgensen)とエー・シー・ハンセン(A. C. Hansen), Ugeskrift for Laeger, 141, 791~793 (1979) 参照。

グルコース感応性試薬のような他の試験系を用いてアスコルビン酸塩の妨害作用を排除する多くの試みが文献に報告されているけれども、今日ま

で、それによつて過酸化活性物質の測定がそれらの悪影響からまぬがれたという成功例は1つも報告されていない。グルコース感応系を用いる場合には、アスコルビン酸塩が試薬に到達する前にそれを伊別する方法から、酵素を用いてその場でアスコルビン酸塩を分解する方法まで種々の方法がある。

すなわち、1970年6月16日、ダーレグビスト(Dalqvist)に与えられたカナダ特許第844,564号は、尿中のグルコース測定用の装置又は他の手段を開示している。それは、通常のグルコース応答性試薬類が含まれた多孔質部分に加えて、更に尿試験試料を受容する部分を含むものである。この試料受容部分は、イオン交換材を含んでおり、装置内におけるその1つの機能は、尿試料中に存在すると考えられる全てのアスコルビン酸塩を吸着することである。

アスコルビン酸塩の妨害を緩和すべき他の試みは、1979年9月18日ダニンガー(Danninger)等に与えられた米国特許第4,168,205号内に

反映されている。この文献は、試薬配合物に酵素であるアスコルビン酸塩オキシダーゼを包含せしめることを提案しているが、その理論は、もしアスコルビン酸塩が試料中に存在すれば、それは酵素作用で酸化されて、目的とする分析に悪影響を及ぼさない化合物であるデヒドロアスコルビン酸塩になるであろうというものである。

1968年11月9日クー(Ku)に与えられた米国特許第3,411,887号は、グルコースオキシダーゼのような酵素的な酸化活性物質に基づく試薬系を用いてアスコルビン酸塩の妨害作用を除去する方法を開示している。アスコルビン酸塩“捕促系”(“trapping system”)が用いられる。これは、“イオン化した状態において、酸化還元指示薬…と〔アスコルビン酸塩〕の間の値の酸化-還元電位  $E^\circ_{red}$  を有するイオン化可能な重金属化合物”から構成される。コバルト、鉄、水銀及びニッケルをはじめとする多くの金属が例として挙げられている。

これらの研究に加えて、グルコース試験に関する

るアスコルビン酸塩の問題に対する注意は、

1. エフチ・ギフホルト (H. Gifford) 等., ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (J. Amer. Med. Assoc.), 178, 149~150 (1961)
2. ピー・オゴーマン (P. O'Gorman) 等., Brit. Med. J., 603~606 (1960)
3. アール・ブランド (R. Brandt) 等., クリニカ・ジミカ・アクタ (Clin. Chim. Acta), 51, 103~104 (1974)
4. アール・ブランド (R. Brandt) 等., アメリカン・ジャーナル・クリニカル・パシロジー (Am. J. Clin. Pathol.), 68, 592~594 (1977)

で述べられている。

上記引用の特許と同じように、他の文献はコバルトを用いたアスコルビン酸塩の酸化及び酸化を取り扱っている。ジーラガクノロ (G. Bragagnolo) [Ann. Chim. Applicata, 31, 360~368, 1941] は、アスコルビン酸の精製

が金属コバルトの存在下で空気によつて酸化されることを報告した。同様な活性は、ジャーナル・オブ・ザ・ケミカル・ソサエティー・オブ・ジャパン [Journal of the Chemical Society of Japan 63, 820~826 (1942)] でトモキチ・イワサキ (Tomokichi Iwasaki) によつて  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_6$  に関して報告されている。

重要なことは、先行技術はグルコース分析を広く取り扱つてゐるが、それは、ペルオキシダーゼ及び過酸化 (ヘモグロビン) のような過酸化活性物質の測定におけるアスコルビン酸塩の妨害問題を解消する方法について有益な示唆を与えていることである。米国特許第3,411,867号 (上を参照) の開示にもかかわらず、この先行技術は要問の余地なく  $\text{Co}(\text{II})$  のような金属イオンが事実類似ペルオキシダーゼであることを教示する。例えば、 $\text{Co}(\text{II})$  酸塩は、クメン過酸化物を触媒的に分解するため商業的に用いられている。ザ・メルク・インデックス (The Merck Index), 9版, 311頁 (1976) 参照。一連の  $\text{Co}(\text{II})$  錠体は、クー-

ロース., (Kh. Lohs) ., Monatsber. Deut. Akad. Wiss. Berlin, 8, 657~659 (1966) (ケミガルアブストラクト, 67, 120383Z, 1967年参照) 過酸化物を触媒的に分解することが報告されている。

以下に述べるように、本発明は過酸化活性物質を測定するための現状の技術体系を改善するものである。このような系は、必ず、クメンヒドロペルオキシドのような有機ヒドロペルオキシドと、トリジン又は3',5,5'-テトラメチルベンジジンのような酸化還元指示薬から構成される。この分析対象物は、それが酵素ペルオキシダーゼに似ているので、指示薬と有機ヒドロペルオキシド間の反応を起として色を生じ、その強度が分析対象物の濃度の指標となる。 $\text{Co}(\text{II})$  錠体によつて示されるペルオキシダーゼ活性に関する誤りようのない先行技術の教示に照らせば、当業者が、かかる物質が過酸化物/指示薬系と相入れるものではないと考えることは明らかであろう。もしも分析対象物を、その存在下で色変化するよう意図された

正にその試薬配合物に入れた場合、誤つた正の結果が得られることが期待される。これらの結論にもかかわらず、驚くべきことには、過酸化活性の  $\text{Co}(\text{II})$  錠体類が、誤つた正の結果をもたらさないばかりか、実際には、かえつて、試薬系を改善して、信頼性あるものに、すなわち、アスコルビン酸塩の妨害作用に基づく不正確さに鋭敏でなくすることが見出された。

簡潔にいえば、本発明は試験試料中の過酸化活性物質の存在を検知するための試験具に関し、その組成物は試料中に存在するアスコルビン酸の妨害作用に対して抵抗性を示す。更に、試験具の製造方法は、同様に、ことで開示されている発明の範囲内にある。この試験具は、有機ヒドロペルオキシドと、過酸化活性物質及び過酸化物の存在下で色の変化のような検知可能な応答を示し得る指示薬が包含された組体 (carrier matrix) から構成される。更に、この組体には  $\text{Co}(\text{II})$  と、構造式:  (ここで、Rは置換若しくは非置換の炭素環又は複素環系の残基である。) を有する

化合物との錯体が含まれている。環は原子数4～7で構成される。

試験組成物中で用いられるべく意図される有機ヒドロペルオキシドは、多くの良く知られた有機ペルオキシド類から選択することができる。しかしながら、それは指示薬の存在下で過酸化活性物質と相互作用して色の変化又は試験組成物によつて吸収若しくは反射される光の量の変化のような検知可能な応答を示すことができなければならぬ。好適であることが判つているヒドロペルオキシド類には、1-ブチルヒドロペルオキシド、クメンヒドロペルオキシド、ジイソプロピルベンゼンヒドロペルオキシド、2,5-ジメチルヘキサン-2,5-ジヒドロペルオキシド、パラメンタンヒドロペルオキシド又はこれらの混合物がある。これらのうち、クメンヒドロペルオキシドが最も好ましいことが判つている。

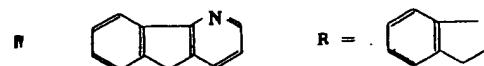
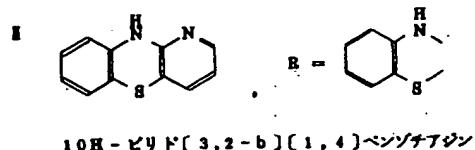
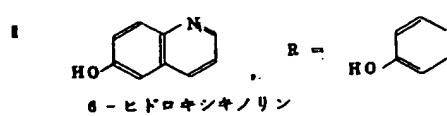
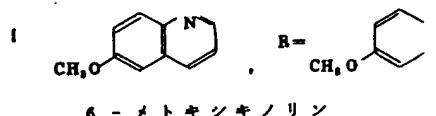
有機ヒドロペルオキシド及び過酸化活性物質の存在下で検知可能な応答を示すことができ、かつそれゆえ本発明に用いて好適な指示薬類は多數存

在する。多くの場合、これらには、いわゆる“ベンジン型”化合物が含まれる。これらのうち典型的なものは、ベンジン、o-トリジン、3,3',5,5'-テトラ(低級アルキル)ベンジン、2,7-ジアミノフルオレン又はこれらの各種割合の混合物である。ここで、“低級アルキル”は、メチル、エチル、o-ブロピル及びイソブロピル並びに各種のブチル、ベンチル及びヘキシル異性体をはじめとする、炭素数1～6を有するアルキル基である。

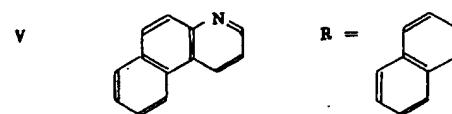
本発明に有用なCo(II)錯体類には、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_6$ 、コバルト(II)アセチルアセトナト、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_6$ 、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{CO}_3]\text{NO}_3$ 、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{CO}_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 及びその他が含まれる。もちろん、他の多くのCo(II)錯体類も、ここで教示される本発明に適用可能であることが理解される。 $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_6$ がすぐれた結果を示し、アスコルビン酸塩の妨害作用を減少せしめるための好ましい錯体であることが見出された。本発明の好ましい態様において、組成物はクメンヒドロペルオキシド、3,3',5,5'-

テトラメチルベンジン及び $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_6$ から構成される。

本発明の総合環化合物は、構造式：  (ここで、Rは炭素環又は複素環の残基であり、それは置換又は非置換であつてもよい。) を有するものとして広く定義される。この定義に含まれるもの化合物で上記構造中のRに関する片割れは以下のとおりである。



4-アザフルオレン



5,6-ベンゾキノリン

上の化合物は、Rが炭素環(I, II, IV及びV)又は複素環(V)であり得ることを示している。これら化合物の混合物もまた用いることができる。更に、以下の例は、これら化合物の効能のみならず、R残基の置換に關し許容される置換の広い変形をも示している。

試験具の製造は、この組成物を適當な担体に包含せしめることから成り、この後者は多様な形態をとり得る。すなわち、米国特許第3,846,247号はフエルト、多孔質のセラミック片及び織布状又はマット状のガラス繊維の使用を教示する。

更に、米国特許第3,552,928号は、木の棒、布、スポンジ材及び粘土質材料の使用を教示する。粗体として合成樹脂のフリース及びガラス繊維のフェルトを使用することが、英国特許第1,369,139号に示唆されている。他の英國特許第1,349,623号は、下層にある紙の粗体（マトリックス）の覆いとして、細い繊維からなる光透過性の網の使用を示している。ポリアミド繊維が仏国特許第2,170,397号に教示されている。しかしながら、本発明におけるこれらの提案例の有用性にもかかわらず、従来技術において、粗体として主として用いられ、しかも、本発明にとつて特に好ましい材料は、伊紙のような吸収性の紙である。かくして、粗体として用いるための適切な材質の選択には多くの余地があり、またこの粗体が多様な物理的形態をとり得ることが理解できる。これらすべてのタイプのものは、本発明の範囲内にあるものとして意図されている。

本発明の成分は、各種の方法で粗体に包含させることができる。それらは、水、ジメチルホルムアミド、クロロホルム、メチレンクロライド、メタノール、シクロヘキサン又はそれらの混合物のような適当な溶媒に溶解又は懸濁することができる。このような溶液又は懸濁液を、ついで、(a)伊紙に含浸せしめるために、(b)適当な粗体の上に試薬類が印刷される場合のインクとして、用いることができ、又、(c)ドクターブレードを用いてのように、組成物で粗体を被覆することができる。粗体と接触されるこれらの及び他の手段は、ここでの発明の範囲内にある。

浸漬液に浸漬して、95°Cで空気乾燥器中で10分間乾燥した。

第2の浸漬液を、以下の成分を表示した順序で混合して調製した。

蒸留水	3.5	ml
クエン酸ナトリウム	1.50	g ***
クエン酸	1.92	g
トリエタノールアミンホウ酸塩	8.5	g
エチレンジアミンテトラ酢酸 (4ナトリウム塩)	0.10	g
メチルスルホン	4.66	g
ドデシル硫酸ナトリウム	0.52	g
ジメチルホルムアミド	3.6	ml ***
3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン	0.42	g ***
クメンヒドロペルオキシド	1.4	g

\*ミリグラム \*\*グラム \*\*\*これらの成分は混合物に添加される前に一緒に合わされた。

この溶液の10ml試料に0.036%の6-ヒドロキシキノリンを添加した。

ついで、第1浸漬液の残渣を含む汎紙片を、第

2浸漬液の10ml試料に浸漬して空気乾燥器で95°Cで10分間乾燥した。

試験具の組立ては、乾燥・含浸された0.6cm角の汎紙を0.6×1.0cmのポリスチレン膜片の一端に、両面接着テープ(3Mカンパニー、ダブル・ステイスク115)を用いて取りつけて行なつた。

ヘモグロビンとアスコルビン酸塩の両者を含む尿中でのこの試験具の試験では、各種のヘモグロビン濃度に対応する容易に識別可能な色水準が得られる。

#### 例2 6-メトキシキノリン

例1の方法に従つて6-メトキシキノリン(6MQ)を含む試験具を製造した。6-ヒドロキシキノリンを用いる代りに、0.040%の6MQを10mlの第2浸漬液の試料に添加した。ヘモグロビンとアスコルビン酸塩の両者を含む尿中でのこの試験具の試験では、ヘモグロビン濃度に対応する容易に識別可能な色水準が得られる。

#### 例3 5,6-ベンゾキノリン

6-ヒドロキシキノリンを用いる代りに、0.045

%の5,6-ベンゾキノリンを第2浸漬液の10ml試料に添加したことを除いては、例1の方法に従つて試験具を製造した。得られた試験具をヘモグロビンとアスコルビン酸塩を含む尿中で試験すると、ヘモグロビン濃度に対応する容易に識別可能な色水準が観察される。

#### 例4 4-アザフルオレン

6-ヒドロキシキノリンを用いる代りに、0.042%の4-アザフルオレンを第2浸漬液の10ml試料に添加したことを除いては、例1の方法に従つて試験具を製造した。得られた試験具をヘモグロビンとアスコルビン酸塩を含む尿中で試験すると、ヘモグロビン濃度に対応する容易に識別可能な色水準が観察される。

#### 例5 10H-ビリド[3,2-b][1,4]ベンゾチアジン

6-ヒドロキシキノリンを用いる代りに、0.050%の10H-ビリド[3,2-b][1,4]ベンゾチアジンを第2浸漬液の10ml試料に添加したことを除いては、例1の方法に従つて試験具を製造

した。得られた試験具をヘモグロビンとアスコルビン酸塩を含む尿中で試験すると、ヘモグロビン濃度に対応する容易に識別可能な色水準が観察される。

#### 例6 各種のCo(II)錯体

尿中の潜血の分析に伴うアスコルビン酸塩の妨害を緩和することに関するCo(II)錯体の効果を明らかにするため、一連の実験を行なつた。したがつて、試験具は例1によつて製造された。2つの浸漬液の組成は以下のとおりであつた。

##### 第1浸漬液

Co(II)錯体(下を参照)	0.0056%
蒸留水	1.00 ml

##### 第2浸漬液

蒸留水	8.0 ml
クエン酸ナトリウム	2.13 g ***
クエン酸	2.77 g
トリエタノールアミンホウ酸塩	5.00 g
メチルスルホン	6.67 g
ラクリル硫酸ナトリウム	0.75 g

エチレジジアミンテトラ酢酸	0.1 3 ♪
ジメチルホルムアミド	5 0.0 ♪
6-メトキシキノリン	0.4 ♪
クメンヒドロペルオキシド	2.0 ♪
3,3',5,5'-テトラメチルベンジン	0.6 0 ♪

\* 第1浸漬液を Co(II)錯体 0.0056 モルとするに充分な量。

\*\*\* ミリリットル \*\*\* グラム

別々に試験具を製造し、そこでは第1浸漬液で用いられる Co(II)錯体が、それぞれ、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_4]$ 、コバルト(II)アセチルアセトナト、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{H}_2\text{O}] \text{Cl}_4$ 、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{CO}] \text{NO}_3$ 、又は  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{CO}_3] \text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  であつた。得られた試験具は、ヘモグロビンとアスコルビン酸塩の両者を含む尿で試験すると、各 Co(II)錯体につき、アスコルビン酸塩の妨害に対する改善された抵抗性を示す。

#### B. アスコルビン酸塩に対する抵抗性の試験

##### 例7. 各種の結合環化化合物の影響

本発明の試験具に対するアスコルビン酸塩の影響を調べるために一連の実験を行なつた。

た色を値 4.0 とした。

結果は、以下のとおりであつた。

例	尿 試 料		1分後の内眼観察結果	
	ヘモグロビン (%)	アスコルビン酸 (%)	対 照	試験具
1	0.1 3 5	2.5	2.0 8	1.0 8
2	0.0 3 8	2.5	2.0 8	2.0 8
3	0.0 3 0	2.5	2.0 8	2.0 8
4	0.0 3 0	2.5	2.0 8	2.0 8
5	0.0 3 0	2.5	2.0 8	2.0 8

\* 异常値

上記データから明らかなように、各種の結合環化合物を用いて製造した試験具は、比較試験具がアスコルビン酸塩の妨害に対する敏感さを示すのに反し、全てが同じように、アスコルビン酸塩の妨害に対する優れた抵抗性をもつている。

##### 例8. 各種 Co(II)錯体の影響

例6で製造された試験具を用いて例7と同様の実験を行なつた。例7の内眼観察法を用いるかわ

試験具を例1～5で記述したようにして製造した。更に、コバルト錯体を除外した、すなわち、第2浸漬液のみを用いて沪紙粗体に含浸せしめた以外は、例6と正に同じ方法で比較試験具を製造した。これらの試験具を、陰性尿及びそれにヒトの全血、アスコルビン酸又はその両者が予め添加された試料を含む試験試料中に浸漬して試験した。

発色を1分後に内眼で観察し、ついで標準の相対的な色強度値に対応する数値を割り付けた。比較試験片を各種の濃度のヘモグロビンを含有するがアスコルビン酸塩を全く含まない尿試料中に浸漬した。標準の色数値は以下のように割り付けた。

ヘモグロビン(%) 0 0.015 0.045 0.135 0.405

色 数 値 0 10 20 30 40

\* デシリットル当たりのミリグラム

かくして、ヘモグロビンを全く存在せしめない尿試料中に比較試験具を浸漬したときに発生する色を、色数値：0とした：一方、100 ml 当り 0.405 mg のヘモグロビンを含む尿によつて発生し

りに、色形成は“迅速走査器 (Rapid Scanner)”として知られる装置を用いて観察された。この装置は、デジタル・エクイップメント・コーポレーション (Digital Equipment Corporation) から入手される PDP-12 コンピュータと接続 (Interface) される走査型反射分光光度計である。この機器は、可視領域での反射スペクトルの迅速測定に用いられる。コンピュータは、スペクトルデータの記憶と演算を行なう。迅速走査器 (Rapid Scanner) での試験片の性能測定は、同一試験片についての内眼観察にまさつて、以下の利点がある：

1. 試料を取り巻く光源及び条件が変らずに維持される。内眼観察では、光源が、波長成分においてのみならず、観察される試験片の位置によつても変動し得る。
2. Rapid Scanner を用いると、検出特性が不变に維持される。内眼観察では、その検出器 (すなわち、観察者の眼) が人によつて異り、また、同一人であつても日によつて異なる。

3. Rapid Scanner は、人間による観察よりも、データの一層正確な定量化を行なうことができ、そのため、結果相互間の比較が、肉眼観察によるよりも、一層客観的に行なえるようになる。

この Rapid Scanner は、ザ・エームス・カンパニー・デイヴィジョン・オブ・マイルス・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド、エルクハート、イングアナ、U.S.A. (the Ames Division of Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana, U.S.A.) によって組立てられた。そしてそこからスペクトル及び性能特性に関する完全な情報を得ることができる。

Rapid Scanner からの三刺激値 (Tri-stimulus values) は、"Supplement No 2 to Commission Internationale de L'Eclairage (Paris, France) Publication No 15, Colorimetry, (E-1.3.1), 1971" で決められている規則に従つて、色差値 (ΔE) を演算するために用いられた。それゆえ、以下この装置からのデータは、ΔE 又は色

差単位に換算して記録される。

すなわち、例 7 のようにして、Co(II) 錫体を全く含まない対照試験具を各種の Co(II) 錫体を含む例 6 の試験具と比較した。この比較は、種々のヘモグロビン濃度の尿でアスコルビン酸塩を含み、また、含まないものを用いて行なつた。

Rapid Scanner によって得られた色差単位 (ΔE) は、以下のようにヘモグロビン濃度 (アスコルビン酸塩の不存在下) に対応する：

ヘモグロビン(%)	0	0.015	0.030	0.045	0.135
ΔE	0	40	50	58	63

このデータは、対照試験具、すなわち、Co(II) 錫体が存在しないことを除いては例 6 のようにして製造された試験具を用いて、Rapid Scanner から得られた。

各種 Co(II) 錫体を含む例 6 の試験具を 0.135% ヘモグロビンを含む尿試料で、アスコルビン酸を有するもの及び有しないものについて試験したとき、その結果は以下のとおりであつた：

Co(II) 錫体	尿 試 料		Rapid Scanner の結果(ΔE)	
	ヘモグロビン (%)	アスコルビン酸 (%)	対 照	試験具
A	0.135	0	6.3	6.7
	0.135	5.0	1.8	3.5
B	0.135	0	6.3	6.0
	0.135	5.0	1.8	2.7
C	0.135	0	6.3	6.2
	0.135	5.0	1.8	4.3
D	0.135	0	6.3	6.4
	0.135	5.0	1.8	4.9

A = Co(II)アセチルアセトナト

B =  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$

C =  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{CO}_2]\text{NO}_3$

D =  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{CO}_2]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

表は、Co(II)錫体と組合せ化合物の存在による、アスコルビン酸塩の妨害に対する鋭敏さにおける劇的な減少を明確に示すデータを表現している。

例 9.

コバルト(II)の過酸化活性に関して先行文献の教示があるため、例 6 のようにして  $\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}_2$  を用いて製造された試験具及び対照試験具 (コバルト錫体をし) とすることを除いては例 6 のようにし

て製造されたもの) を、安定性について、試験した。Co(II) の存在下では組成物中のクメンヒドロペルオキシドが分解されるだろうという予想にもかかわらず、この実験は、試験具間の安定性の相違を、実質上は、なんら示さなかつた。

コバルト含有のものと対照のものを、両者を空気乾燥器中 50°C で 2 週間保存して促進試験に付した。ついで、これらの促進試験に付した試験具ならびに促進試験に付さない試験具を、陰性尿及び種々の量のヒト全血を予め添加した陰性尿中に浸漬した。発色を例 6 におけるように、すなわち、1 分後肉眼で評価した。そのデータは以下のとおりである：

ヘモグロビン (%)	対 照		本 発 明	
	1 分後の肉眼観察結果		1 分後の肉眼観察結果	
	促進試験なし	2 週間, 50°C	促進試験なし	2 週間, 50°C
0.000	0	0	0	0
0.015	2.0	1.9	2.0	1.8
0.030	2.2	2.1	2.1	2.1
0.045	2.5	2.5	2.5	2.3
0.135	3.0	3.2	3.2	3.0
0.405	4.0	4.0	4.0	4.0

上のデータから理解できるように、過酸化物と  $\text{Co}(\text{II})$  が、60℃で2週間の保存後でさえ、両立しないということが全くないことが明らかである。更に、コバルト含有の試験具は、コバルト(II)の存在しない対照試験具と同等の感度を有する。

### C. 試験具の製造方法

#### 例 1.0.

試験具の製造方法を調べ、担体に対する試験液の添加順序を変えたときの影響を明確にするために、実験を行なつた。第1浸漬液(例6)として  $\text{Co}(\text{II})$  錫体を添加して試験具を製造するときは、優れたアスコルビン酸塩に対する抵抗性が認められる。しかしながら、添加の順序を逆にしたとき、すなわち、錫体が第2浸漬液として添加された場合には、アスコルビン酸塩に対する抵抗性は消滅していくことが観察された。驚くべきことには、結合強化物が第2浸漬液で  $\text{Co}(\text{II})$  と一緒に合わされているときは、アスコルビン酸塩に対する抵抗性が例6のようにして製造された試験具の水準に回復する。

3セットの試験具を製造した。セット(a)は、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_6$  を沢紙担体に第1浸漬液として包含させ、結合強化物を含む残りの成分を第2浸漬液として添加して製造した。セット(b)の試験具は、セット(a)の逆の添加順序、すなわち、コバルト錫体を第2浸漬液とし、他の成分は第1浸漬液にして製造した。セット(c)は、第2浸漬液がコバルト錫体と結合強化物の両者から成る場合に製造された試験具を表わす。

#### セット(a) 第1浸漬液中の $\text{Co}(\text{II})$

試験具を製造し、そこでは  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_6$  が、0.13%の  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_6$  を1.0 mlの蒸留水に溶解して成る組成の水性第1浸漬液として添加された。この溶液を実験室用の沢紙片(イートン・アンド・ダイクマン社 237)に含浸させて用い、ついで10分間、90℃で空気乾燥器中で乾燥した。

表示した順序で以下の成分を組合せて第2浸漬液を調製した：

蒸留水	2.5 ml
クエン酸ナトリウム	1.07 g

クエン酸	1.38 g
トリエチノールアミンホウ酸塩	3.33 g
メチルスルホン	3.33 g
ジメチルホルムアミド	2.50 ml
6-メトキシキノリン	2.00 ml
クメンヒドロペルオキシド	1.0 ml
3,3',5,5'-テトラメチルベンジン	0.30 g
この溶液 2.0 ml にラクリル酸	
ナトリウムを加えた	0.20 g
エチレンジアミンテトラ酢酸	0.01 g

4ナトリウム塩の第2浸漬液をつくるため。乾燥した、コバルト含浸の沢紙を第2浸漬液に浸漬し、ついで前と同様に、95℃で10分間乾燥した。

この方法でつくられた試験具を、尿中ヘモグロビンを分析するために用いたときのアスコルビン酸塩の妨害作用に対するそれらの抵抗性を調べるために、下に示したようにして試験を行なつた。結果は、以下の通りである。

尿試料		肉眼観察の結果
ヘモグロビン (%)	アスコルビン酸 (%)	
0	0	3
0.135	0	3.0
0.135	5.0	2.0

このデータは良好なアスコルビン酸塩抵抗性、すなわち、ヘモグロビン分析に伴う比較的小さな妨害作用を示している。

#### セット(b) 第2浸漬液中の $\text{Co}(\text{II})$

試験具の第2のセットを製造し、ここではコバルト錫体を第2浸漬液として添加した。この実験では、上でセット(a)のために用いた沢紙片を第2浸漬液に浸漬し、乾燥し、ついでコバルトを含む第1浸漬液に浸漬して再び乾燥した。添加の順序を逆にしている以外、その方法はセット(a)で適用したことと同じである。

ヘモグロビン及び/又はアスコルビン酸塩を含む、又は含まない尿で、例4のようにして試験したとき、その結果は以下の通りであつた：

尿試料		肉眼観察の結果
ヘモグロビン (ppm)	アスコルビン酸 (ppm)	
0	0	1
0.135	0	28
0.135	5	5

このデータは、試験試料中のアスコルビン酸塩による妨害作用に対し劇的な鋭敏性を示している。

セット(c) — 第2浸漬液中のCo(II)及び結合環化合物

試験具の第3のセットを製造し、そこでは第2浸漬液はコバルト錯体と結合環化合物の両者を含んでいた。

表示した順序で以下の成分を組合せて第1浸漬液を調製した：

蒸留水	5.0 ml
クエン酸ナトリウム	2.13 g
クエン酸	2.77 g
トリエタノールアミンホウ酸塩	6.67 g
エチレンジアミンテトラ酢酸4ナトリウム	0.07 g

メチルスルホン 0.67 g

ラウリル硫酸ナトリウム 1.00 g

この溶液の試料1.0 mlに、ジメチルホルムアミド1.0 ml、クメンヒドロペルオキシド0.4 ml及び3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン0.12 mlを添加した。

実験用汎紙片(イートン・アンド・ダイクマン社222)を第1浸漬液に浸漬し、空気乾燥器内で10分間、95°Cで乾燥し、それから乾燥汎紙を第2浸漬液に浸漬した。

第2浸漬液は、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_6$  0.24 gを蒸留水8.0 mlに溶解して調製した。この溶液1.0 mlにジメチルホルムアミド1.0 mlを、つづいて6-メトキシキノリン8.0 mlを添加した。第2浸漬液に浸漬したのにつづいて、この汎紙を再び10分間95°Cで乾燥した。

アスコルビン酸塩を含む、又は含まないヘモグロビンを含有する尿中にこの試験汎紙を浸漬すると、以下のデータが得られた：

尿試料		肉眼観察の結果
ヘモグロビン (ppm)	アスコルビン酸 (ppm)	
0.135	0	5
0.135	0	40*
0.135	50	38*

\*これらの試験具は、上記のセット(a)及びセット(b)の試験具より感度がよいことに注意されたい。これはたぶん、イー・アンド・デイ-237の代りにイー・アンド・デイ-222汎紙を用いたからである。

このデータは、セット(c)の試験具を尿中ヘモグロビンの分析に用いると、アスコルビン酸塩の妨害作用に対し、非常な程度の抵抗性を有することを示している。